

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

28.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 6月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-174896

[ST.10/C]:

[J P 2 0 0 2 - 1 7 4 8 9 6]

REC'D. 20 JUN 2003

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant(s):

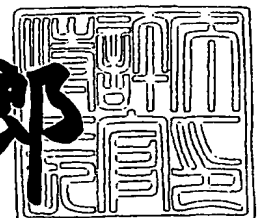
アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3042069

【書類名】 特許願

【整理番号】 R6820

【提出日】 平成14年 6月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/26

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 米原 聡

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 石丸 香

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 平井 香

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 スルホン酸化合物およびニトロ化合物を用いた測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物を含む試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加する、前記測定対象物の測定方法。

【請求項 2】 前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加する請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】 スルホン酸化合物が、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDBS)、ラウリル硫酸リチウム (LILS)、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム (ABSA)、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸 2 ナトリウム (ANDS) および 4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸 2 ナトリウム (DADS) からなる群から選択された少なくとも一つの化合物である請求項 1 または 2 記載の測定方法。

【請求項 4】 前記酸化還元反応の測定が、酸化酵素と酸化により発色する基質とを用いた前記酸化物質量の測定である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 5】 前記酸化により発色する基質が、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、トリンダー試薬と 4-アミノアンピリンとの組み合わせ、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4'-トリアミノトリフェニルメタンヘキサジウム塩、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェナチジンナトリウム塩、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェナチジンおよび 10-(カルボキシアミノメチル-4-ヒンゾアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェナチジンナトリウム塩からなる群から選択された少なくとも一つの化合物であって、前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加する請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 6】 前記酸化により発色する基質が、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(3-ス

ルホフ ロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタン ヘキサデ イウム塩、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ (2-ヒト ロキシ-3-スルホ ロピル) -4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタン ヘキサデ イウム塩、10-(カルボ キシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン ナトリウム塩、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンおよび10-(カルボ キシアミノメチル-4-ベンゾ アミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩からなる群から選択された少なくとも一つの化合物であって、前記酸化還元反応に先立ち、少なくともスルホン酸化合物を前記試料に添加する請求項1～4のいずれか一項に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

従来から、酸化還元反応を利用して、試料中の測定対象物の量を測定することは、広く実施されており、例えば、生化学分析や臨床検査等における糖化タンパク質の測定にも適用されている。

【0003】

例えば、血液中の糖化タンパク質、特に赤血球中の糖化ヘモグロビンは、生体血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされている。このような赤血球中の糖化タンパク質は、前記酸化還元反応を用いて、例えば、以下に示すようにして測定されている。

【0004】

まず、赤血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）で処理し、糖化タンパク質の糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化タンパク質量に対応する。そして、この試料に、例えば、ペルオキシダーゼ（以下、「POD」という）および酸化により発色する基質（発色基質）を添加し、前記PODを触媒として前記過酸化水素と前記発色基質との間で酸化還元反応させる

。この時、酸化によって前記酸化基質が発色するため、この発色を測定することによって前記過酸化水素量を測定でき、この結果、赤血球中の糖化タンパク質量を知ることができる。

【0005】

しかし、血液中には、通常、アスコルビン酸（AsA）、ビリルビン等の各種還元物質が存在し、さらに、赤血球中には、グルタチオン（GSH）等の各種還元物質が存在する。これらの還元物質により、例えば、前記過酸化水素が還元されたり、前記酸化還元反応が阻害されたり、前記還元剤が発色した後に還元され退色するおそれがある。このため、赤血球中の糖化タンパク質量を正確に測定することが困難であるという問題があった。

【0006】

また、試料ごとによって、含まれる還元物質の濃度も一定ではないため、測定精度が劣るという問題もあった。

【0007】

このような問題を回避するために、例えば、種々の酸化剤を前記試料に添加するという方法がある。例えば、特開昭56-151358号公報には、酸化剤としてヨウ素酸、過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物を用いる方法が開示されており、特開昭57-13357号公報、特開昭57-161650号公報、特開昭59-193354号公報、特開昭62-169053号公報、特開平3-30697号公報には、酸化剤としてコバルト、鉄、セリウム等の金属錯体を用いる方法が開示されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これら従来の方法では、試料によっては測定精度が十分に向上しない場合もある。また、前述のように、血液中の糖化タンパク質は、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされているため、これを測定するための酸化還元反応を用いた測定方法においても、更なる測定精度の向上が望まれている。

【0009】

そこで、本発明の目的は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定

する方法であって、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法の提供である。

【0010】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明の測定方法は、ヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物を含む試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加することを特徴とする。

【0011】

本発明者らは、前記従来の方法では、前記GSHやAsAのような低分子量還元物質の影響は排除されるが、タンパク質等のような高分子量還元物質による影響が排除されず、一方、テトラゾリウム化合物で処理すれば、前記低分子量還元物質だけでなく、前記高分子量還元物質、特にヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物（以下、両者あわせて「ヘモグロビン」という）の酸化還元物質としての影響も排除できることを見出した。なお、これについて、本出願人は別途出願している。しかしながら、前記テトラゾリウム化合物は、例えば、溶解性が低いため高濃度のヘモグロビンに対応させ難く、また、テトラゾリウム化合物自体が酸化還元力を有するため、前記発色基質に作用して誤発色を生じるおそれがあるという問題があった。そこで、本発明者らは、測定系に影響を与えずにヘモグロビンの影響を排除すべく、さらに鋭意研究を行った。その結果、試料をスルホン酸化合物やニトロ化合物で処理することによって、測定系に影響与えることなくヘモグロビンの影響を防止できることを見出し、本発明に到達した。このような本発明の測定方法によれば、よりいっそう高精度な測定が可能となるため、前述のような臨床医療等における各種検査に有用である。

【0012】

本発明の測定方法において、前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加して前記試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の酸化還元物質としての影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の酸化物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定することが好ましい。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

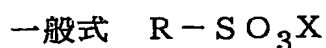
前述のように、本発明の測定方法は、ヘモグロビンを含む試料に、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を添加して、前記試料中のヘモグロビンの還元物質としての影響を排除し、その後、前記試料中の測定対象物由来の酸化物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する測定方法である。

【 0 0 1 4 】

本発明において、前記試料中のヘモグロビンの影響を排除するために添加する物質は、例えば、スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方でもよいが、より一層影響を排除できることから、前記酸化還元反応に先立ち、前記化合物の両方を前記試料に添加することが好ましい。なお、スルホン酸化合物とニトロ化合物の両方を添加する場合、添加の順序は制限されず、両方を同時に添加してもよいし、別々に添加してもよい。

【 0 0 1 5 】

本発明において、前記スルホン酸化合物としては、例えば、



で表わされる化合物が使用できる。前記式において、Xは、例えば、Na、K、Li、H等、Rは、例えば、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-C_6H_4-(CH_2)_nCH_3$ 等が好ましい。前記Rにおけるnは、例えば、3～20の範囲である。また、Rは、疎水基を有することが好ましい。

【 0 0 1 6 】

前記スルホン酸化合物の具体例としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム（以下、「SLS」という）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下、「SDBS」という）、ラウリル硫酸リチウム（以下、「LiLS」という）、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム（以下、「ABSA」という）、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「ANDS」という）、4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「DADS」という）等が使用でき、より好ましくは、SLS、SDBS、LiLSである。

【0017】

本発明において、前記ニトロ化合物としては、特に制限されないが、例えば、ニトロベンゼン化合物やジニトロベンゼン化合物等があげられる。これらの化合物は、ベンゼン環がニトロ基の他に、例えば、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n=2\sim 9$) 等の置換基を有することが好ましく、これらの中でも親水基を置換基として有することが好ましい。

【0018】

前記ニトロ化合物の具体例としては、例えば、2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP)、p-ニトロフェノール (p-NP)、2,4-ジニトロアニリン (2,4-DNA)、p-ニトロアニリン (p-NA)、亜硝酸ナトリウム (NaNO_2)、亜硝酸カリウム (KNO_2)、4-アミノ-4'-ニトロスルホン-2,2'-ジスルホン酸 2ナトリウム (以下、「ANPS」という)、ニトロベンゼン等が使用できる。

【0019】

また、スルホン酸化合物とニトロ化合物とを併用する場合、これらの組み合わせは特に制限されない。

【0020】

これらのスルホン酸化合物やニトロ化合物は、例えば、前述のようなテトラゾリウム化合物に比べて溶解性に優れるため、試料中のヘモグロビンの濃度が高濃度であっても処理が容易であり、また、コストの面でも低価格であるため、非常に有用である。

【0021】

本発明の測定方法において、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物の添加量は、特に制限されず、例えば、試料の種類、前記試料に含まれるヘモグロビンの量やその他の還元物資の量等などによって適宜決定できる。具体的な例を以下に示す。

【0022】

スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方を添加する場合は、例えば、試料 $1\ \mu\text{l}$ 当たり、いずれかの化合物を、 $0.01\sim 1000\ \mu\text{mol}$ の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは $0.03\sim 200\ \mu\text{mol}$

0.1の範囲、特に好ましくは、0.05～40 μmol の範囲である。

【0023】

また、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を添加する場合は、例えば、試料1 μl 当たり、前記スルホン酸化合物0.005～20 μmol の範囲、ニトロ化合物0.005～25 μmol の範囲で添加することが好ましく、より好ましくはスルホン酸化合物0.02～4 μmol の範囲、ニトロ化合物0.01～5 μmol の範囲である。

【0024】

本発明において、前記酸化還元反応の測定は、酸化酵素と酸化により発色する基質（発色基質）とを用いた前記酸化物質量の測定であることが好ましい。

【0025】

前記発色基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム（以下、「DA-64」という）、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合わせ、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサソディウム塩（以下、「TPM-PS」という）、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサソディウム塩（以下、「TPM-OS」という）、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェニチアジンナトリウム塩（以下、「DA-67」という）、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェニチアジン（以下、「MCDP」という）、10-(カルボキシメチルアミノ-4-ベンゾアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェニチアジンナトリウム塩（以下、「MMX」という）等が使用できる。これらの中でも、例えば、TPM-PS、TPM-OS等のトリフェニルメタン系の発色基質が好ましく、その中でも特にトリアミノトリフェニルメタン系の発色基質が好ましい。

【0026】

前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記トリンダー試薬と組み合わせる化合物としては、前記4-アミノアンチピリンの他に、例えば、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（MBTH）、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（SMBTH）等も使用で

きる。

【0027】

以上に例示する発色基質は、通常、400nm以上に吸収を持つため、同様に400nmに吸収を持つ、前述のようなテトラゾリウム化合物を使用した場合、測定値に誤差が生じるおそれがあった。しかし、例示した前記スルホン酸化合物やニトロ化合物は、400nm以上に吸収を持たないため、これらの発色基質と併に使用しても、誤差が生じるおそれがない。

【0028】

また、これらの発色基質と、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物との組み合わせは、特に制限されないが、発色反応が精度良く行われることから、例えば、以下の組み合わせが好ましい。なお、この発色基質と、スルホン酸化合物およびニトロ化合物との組み合わせに応じて、発色反応の精度向上が見られることの理由は不明である。

【0029】

前記発色基質が、DA-64、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合わせ等の場合、前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加することが好ましく、例えば、前記スルホン酸化合物としては、SLS、SDBS、LiLSを、ニトロ化合物としては2,4-DNA、2,4-DNP、PNA、PNPを使用することが好ましい。

【0030】

一方、前記発色基質が、TPM-PS、TPM-OS、DA-67、MCDP、MMX等の場合、前記酸化還元反応に先立ち、少なくともスルホン酸化合物を前記試料に添加することが好ましく、より好ましくは、スルホン酸化合物とニトロ化合物の両方を添加する。

【0031】

本発明において、前記酸化還元反応の測定は、前記基質の酸化による発色の吸光度測定であることが好ましい。

【0032】

本発明において、前記測定対象物由来の酸化物質が過酸化水素であることが好

ましい。

【0033】

本発明の測定方法において、前記測定試料は、特に制限されないが、全血、血漿、血清、血球等の血液試料の他に、例えば、尿、髄液、唾液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等もあげられる。

【0034】

本発明の測定方法において、前記測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば特に制限されないが、例えば、全血中成分、赤血球内成分、血漿中成分、血清中成分等もがあげられ、好ましくは赤血球内成分である。また、具体的には、例えば、糖化ヘモグロビンや糖化アルブミン等の糖化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、尿酸、コレステロール、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられ、より好ましくは糖化タンパク質である。例えば、前記赤血球成分を測定する場合、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。

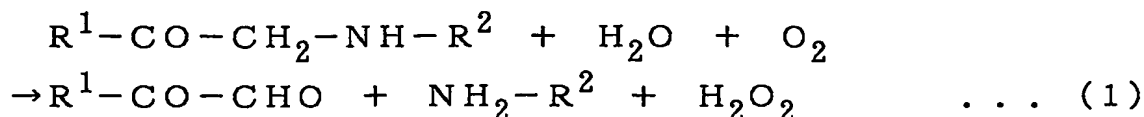
【0035】

本発明の測定方法において、測定対象物が糖化タンパク質の場合、前記糖化タンパク質の糖化部分をFAODで酸化分解することにより、前記測定対象物由来の酸化物質である過酸化水素を生成させることが好ましい。また、前記糖化ペプチド、糖化アミノ酸も、同様にFAODを作用させることが好ましい。なお、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドは、必要に応じて、前記FAOD処理前に、プロテアーゼ処理することが好ましい。

【0036】

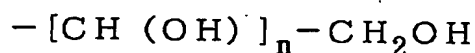
前記FAODとしては、下記式(1)に示す反応を触媒するFAODであることが好ましい。

【0037】



【0038】

前記式(1)において、 R^1 は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を示す。前記糖残基(R^1)は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基(R^1)は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基(R^1)は、例えば、



で示すことができ、 n は、0～6の整数である。

【0039】

前記式(1)において、 R^2 は、特に制限されないが、例えば、糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、 α -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで異なる。

【0040】

前記式(1)において、 α -アミノ基が糖化されている場合、 R^2 は、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。

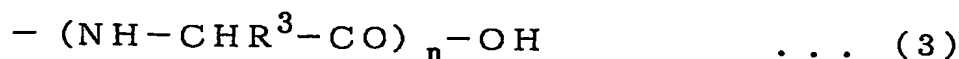
【0041】



【0042】

前記式(2)において、 R^3 はアミノ酸側鎖基を示す。また、 R^4 は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 n は、0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

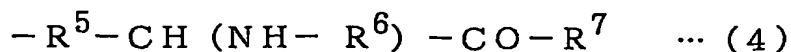
【0043】



【0044】

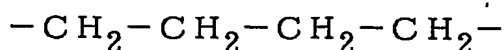
また、前記式(1)において、 α -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている(アミノ酸側鎖基が糖化されている)場合、 R^2 は下記式(4)で示すことができる。

【0045】



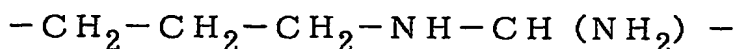
【0046】

前記式(4)において、 R^5 は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 R^5 は



であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 R^5 は、

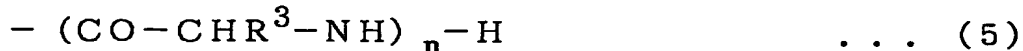


である。

【0047】

また、前記式(4)において、 R^6 は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、 n は0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

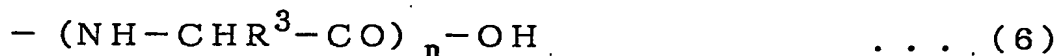
【0048】



【0049】

また、前記式(4)において、 R^7 は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(6)で示すことができる。なお、下記式(6)において、 n は0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

【0050】



【0051】

(実施形態1)

つぎに、本発明の測定方法について、血球中の糖化タンパク質を測定する例をあげて説明する。

【0052】

まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限さ

れず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

【0053】

前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニル エーテル (Triton系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン ソルビタン アルキル エステル (Tween系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン アルキル エーテル (Brij系界面活性剤等) 等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、TritonX-100、Tween-20、Brij35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.01～5重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、数秒(約5秒)～10分程度攪拌すればよい。

【0054】

つぎに、前記溶血試料に対して、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を添加し、前記溶血試料の前処理を行なう。

【0055】

前記スルホン酸化合物とニトロ化合物は、いずれか一方でもよいし、両方を添加してもよいが、前述のように後の工程で使用する発色基質の種類によって、適宜決定することが好ましい。

【0056】

スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方を添加する場合、その添加量は特に制限されず、前述の添加割合があげられる。具体的には、この前処理溶液中の血球濃度が1体積%の場合、例えば、ニトロ化合物の濃度が0.05～500mmol/リットルの範囲であり、好ましくは0.2～100mmol/リットルの範囲である。また、この前処理溶液中の血球濃度が1体積%の場合、例えば、スルホン酸化合物の濃度が0.05～200mmol/リットルの範囲であり、好ましくは0.2～40mmol/リットルの範囲である。

【0057】

また、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を試料に添加する場合も、その添加量は特に制限されず、例えば、前述の添加割合があげられる。具体的には、この前処理溶液中の血球濃度が、1体積%の場合、例えば、スルホン酸化合物濃度0.05~200mmol/リットル、ニトロ化合物濃度0.05~250mmol/リットルの範囲であり、好ましくはスルホン酸化合物濃度0.2~40mmol/リットル、ニトロ化合物濃度0.1~50mmol/リットルの範囲である。このようにスルホン酸化合物とニトロ化合物との両方を添加する場合、前述のように、いずれを先に添加してもよいし、また同時に添加してもよい。

【0058】

前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物は、そのまま使用してもよいが、操作の簡便性や処理効率等の点から、溶媒に溶解したスルホン酸化合物溶液またはニトロ化合物溶液として使用することが好ましい。前記各溶液の濃度は、その種類等により適宜決定でき、例えば、スルホン酸化合物溶液は、5~1000mmol/リットルの範囲であり、好ましくは5~400mmol/リットルの範囲であり、ニトロ化合物溶液は、0.5~100mmol/リットルの範囲であり、好ましくは1~50mmol/リットルの範囲である。前記溶媒としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が使用でき、前記緩衝液としては、例えば、後述の緩衝液等が使用できる。なお、前記両化合物は、それぞれ一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

【0059】

この前処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、アミン系緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、ならびにMOPS、CHES、CAPSおよびCAPSO等のグッド緩衝液等が使用できる。前記アミン系緩衝液の緩衝剤としては、例えば、グリシン、エチルアミン、ジエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリスヒドロキシアミノメタン、トリエタノールアミン、グリシンアミド等があげられる。

【0060】

前記緩衝液のpHは、pH7~12の範囲が好ましく、より好ましくはpH8

～11の範囲であり、特に好ましくはpH8～10の範囲である。

【0061】

この前処理の条件は、特に制限されないが、通常、温度10～37℃の範囲であり、処理時間10秒～60分の範囲である。

【0062】

なお、この前処理に使用するスルホン酸化合物として、前述のようなラウリル硫酸ナトリウム等を使用する場合は、これ自身が界面活性剤としての作用を奏するため、例えば、前述のような溶血処理と、この前処理とを同じ物質の添加によって、同時に行うことが可能である。

【0063】

つぎに、この前処理済み溶血試料に対し、プロテアーゼ処理を行う。これは、後の処理に使用するFAODを測定対象物に作用し易くするためである。

【0064】

前記プロテアーゼの種類は、特に制限されず、例えば、プロテアーゼK、ズブチリシン、トリプシン、アミノペプチダーゼ、メタロプロテアーゼ等が使用できる。プロテアーゼ処理の条件は、使用するプロテアーゼの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

【0065】

具体的には、例えば、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼKを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度10～30,000mg/リットル、反応液中の血球濃度0.05～15体積%、反応温度15～37℃、反応時間1分～24時間、pH6～12の範囲である。このプロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、前記前処理と同様の緩衝液が使用できる。

【0066】

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、前記FAODで処理する。このFAOD処理により、前記式(1)に示す反応が触媒される。

【0067】

このFAOD処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好

ましい。その処理条件は、使用するFAODの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

【0068】

具体的には、例えば、反応液中のFAOD濃度50～50,000U/リットル、反応液中の血球濃度0.01～1体積%、反応温度15～37℃、反応時間1～60分、pH6～9の範囲である。前記緩衝液の種類も特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

【0069】

つぎに、前記FAOD処理で生成した過酸化水素を、PODおよび前記発色基質を用いて酸化還元反応により測定する。

【0070】

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のPOD濃度10～100,000IU/リットル、発色性基質濃度0.005～30mmol/l、反応温度15～37℃、反応時間0.1～30分、pH5～9である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、前記プロテアーゼ処理およびFAOD処理等と同様の緩衝液等が使用できる。

【0071】

前記酸化還元反応において、例えば、前記発色性基質を用いた場合、前記反応液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の量を測定できる。そして、この過酸化水素濃度と検量線等とを用いて、試料中の糖化タンパク質量を求めることができる。

【0072】

なお、前記過酸化水素量は、前記POD等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

【0073】

この測定方法において、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物による前処理工程は、前述のように、酸化還元反応が実質的に生じる前であれば、特に制限されないが、前記FAOD処理後に過酸化水素が発生することから、前記FAOD処

理前に行なうことが好ましい。また、各処理工程は、前述のように別々に行ってもよいが、例えば、以下に示すような組み合わせで同時に行ってもよい処理工程がある。

【 0 0 7 4 】

- 1 : 溶血処理 + 前処理
- 2 : 溶血処理 + 前処理 + プロテアーゼ処理
- 3 : プロテアーゼ処理 + F A O D 処理
- 4 : F A O D 処理 + P O D 酸化還元処理
- 5 : プロテアーゼ処理 + F A O D 処理 + P O D 酸化還元処理

【 0 0 7 5 】

また、スルホン酸化合物やニトロ化合物の添加順序や、前記 F A O D、P O D および発色性基質の添加順序も特に制限されない。

【 0 0 7 6 】

このような方法によれば、前記試料にスルホン酸化合物やニトロ化合物を接触させることにより、G S H、A s A、ジチオスレイトール、システイン、N-アセチル-システイン等の低分子量還元物質だけでなく、特にヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を十分に排除することができる。このため、例えば、酸化還元反応反応や吸光度測定になんら影響与えることなく、高精度で測定を行うことができる。

【 0 0 7 7 】

また、本発明の測定方法の前記前処理工程において、例えば、前記スルホン酸化合物やニトロ化の他に、さらに酸化剤や酵素を併用してもよい。前記酸化剤としては、例えば、ヨード酢酸ナトリウム、ヨウ素酸、過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物、E D T A - F e 等があげられ、酵素としては、例えば、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等が使用できる。このような酸化剤の添加量は、例えば、試料 1 μ l 当たり 0. 0 0 1 ~ 0. 1 m g の範囲である。

【 0 0 7 8 】

本発明の測定方法において、測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば、特に制限されず、前記糖化タンパク質の他に、前述のように、糖化ペプチ

ド、糖化アミノ酸、グルコース、コレステロール、尿酸、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられる。

【0079】

過酸化水素を発生させて、前記各測定対象物の量を測定する場合は、例えば、前記グルコースにはグルコースオキシダーゼを、前記コレステロールにはコレステロールオキシダーゼを、前記尿酸にはウリカーゼを、前記クレアチニンにはサルコシンオキシダーゼを、前記サルコシンにはサルコシンオキシダーゼを、前記グリセロールにはグリセロールオキシダーゼを、それぞれ作用させて過酸化水素を発生させればよい。この過酸化水素量の測定方法は、前述と同様にして行なうことができる。また、糖化ペプチド、糖化アミノ酸は、例えば、前記糖化タンパク質の測定と同様にして測定できる。

【0080】

また、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物による試料中のヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の処理後、測定対象物由来の還元物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から、前記測定対象物の量を決定する場合は、例えば、以下に示すようにして測定を行なうことができる。

【0081】

例えば、前記測定対象物がグルコースの場合、例えば、 NAD^+ や NADP^+ 等の存在下、グルコースデヒドロゲナーゼを用いて、 NADH や NADPH 等の還元物質を発生させる。そして、前記測定対象物由来の還元物質である NADH や NADPH を、例えば、ジアホラーゼと、還元により発色する基質とを用いて、酸化還元反応により測定する。そして、前述のように、この測定対象物由来の還元物質の濃度と検量線等とを用いて、試料中の測定対象物の量を求めることができる。また、例えば、測定対象物がコレステロールの場合はコレステロールデヒドロゲナーゼを、サルコシンの場合は、サルコシンデヒドロゲナーゼをそれぞれ使用できる。

【0082】

前記還元により発色する基質としては、特に制限されないが、例えば、前記発色性のテトラゾリウム化合物や、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール

等が使用できる。

【0083】

【実施例】

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

【0084】

(実施例1)

この実施例は、発色性基質としてTPM-PSを使用して、フルクトシルバリン（以下、「FV」という）を含むヘモグロビン試料を、スルホン酸化合物およびニトロ化合物で処理し、FV量を測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

【0085】

(測定試料の調製)

ヘモグロビン凍結品を精製水で溶解し、50g/リットルのヘモグロビン溶液を調製した。一方、FVを、特開平2-69644号公報にしたがって製造し、これを精製水に溶解して、1mMのFV溶液を調製した。そして、前記ヘモグロビン溶液37 μ l、FV溶液60 μ lおよび精製水203 μ lを混合して、測定試料とした。

【0086】

(第1試薬)

スルホン酸化合物	3.2mM、6.4mMまたは12.8mM
界面活性剤（ポリオキシエチレン(9)トデシルエーテル）	1.85g/L
CHES-CHES・Na緩衝液（pH9.4）	40mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液（pH9.4）	15mM

【0087】

前記第1試薬のスルホン酸化合物としては、SLS（カネイズカ社製）、SDBS（和光純薬社製）、ABSA（東京化成社製）、ANDS（東京化成社製）、DADS（東京化成社製）をそれぞれ使用した。

【0088】

(第2試薬)

ニトロ化合物 (2,4-DNA : 和光純薬社製)	0 mM 又は 0.9 mM
メタロプロテアーゼ (アークレイ社製)	2.0 MU/L
CaCl ₂	2.5 mM
NaCl	50 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)	1.0 mM

【0089】

(第3試薬)

FAOD (アークレイ社製)	18 KU/L
POD (キッコーマン社製)	67 KU/L
CaCl ₂	2.5 mM
TPM-PS (同仁化学社製)	0.25 mM
ADA緩衝液 (pH7.0)	300 mM

【0090】

(方法)

前記測定試料 0.14 μ L に前記第1試薬 8.26 μ L を添加した後、さらに、前記第2試薬 75.6 μ L を混合して、37℃で5分間放置した。そして、この混合液に前記第3試薬 18.9 μ L を混合し、37℃でインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を商品名 JCA-BM8 (日本電子社製) で測定した。測定波長は、主波長 571 nm、副波長 805 nm とした。一方、比較例としては、第1試薬のスルホン酸化合物、第2試薬のニトロ化合物を添加してない以外は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。なお、試料に第1試薬および第2試薬を混合した時点での、試料 1 μ L に対するスルホン酸化合物の添加量は、0.189 μ mol、0.378 μ mol、0.755 μ mol であり、ニトロ化合物の添加量は、3.46 μ mol であった。

【 0 0 9 1 】

(表 1)

	スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度 (mAbs)
実施例 1-1	SLS (3.2)	2,4-DNA (0.9)	1 4 9
1-2	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	1 5 4
1-3	SLS (12.8)	2,4-DNA (0.9)	1 6 0
1-4	SDBS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	1 2 1
1-5	SLS (6.4)	—	1 5 4
1-6	ABSA (6.4)	—	1 3 2
1-7	ANDS (6.4)	—	1 1 3
1-8	DADS (6.4)	—	1 2 4
比較例 1	—	—	3 0

【 0 0 9 2 】

前記表 1 に示すように、実施例 1 のように、各種スルホン酸化合物またはこれらとニトロ化合物との併用によって、比較例に比べて、試料中の F V 量を示す吸光度が増加した。これから、本実施例によれば、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物によって、試料中のヘモグロビンの影響が排除されたことがわかる。

【 0 0 9 3 】

(実施例 2)

この実施例は、発色性基質として DA-64 を使用して、F V を含むヘモグロビン試料を、スルホン酸化合物およびニトロ化合物で処理し、F V 量を測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

【 0 0 9 4 】

(測定試料の調製)

前記実施例 1 において調製したヘモグロビン溶液 6 0 μ L と、前記 F V 溶液 3 7 μ L および精製水 2 0 3 μ L を混合して、測定試料とした。

【 0 0 9 5 】

(第 1 試薬)

スルホン酸化合物 (SLS : ナガイシク社製)

6 . 4 mM

界面活性剤 (ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル)	1. 85 g/L
CHES-CHES・Na緩衝液 (pH9.4)	40 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH9.4)	15 mM

【0096】

(第2試薬)

ニトロ化合物	0.9 mM
メタロプロテアーゼ (アークレイ社製)	2.0 MU/L
CaCl ₂	2.5 mM
NaCl	50 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)	1.0 mM

【0097】

前記ニトロ化合物としては、2,4-DNA (和光純薬工業社製)、p-NA (和光純薬工業社製)、p-NP (和光純薬工業社製)、NaNO₂ (ナカライテスク社製)、2,4-DNH (和光純薬工業社製) をそれぞれ使用した。なお、ニトロ化合物を二種類添加する場合は、それぞれ0.9 mMとし、合計1.8 mMとした。

【0098】

(第3試薬)

FAOD (アークレイ社製)	17.5 KU/L
POD (キッコーマン社製)	67 KU/L
DA-64 (和光純薬工業社製)	70 μM
Tris-HCl緩衝液 (pH7.0)	300 mM

【0099】

(方法)

前記測定試料0.14 μLに前記第1試薬8.26 μLを添加した後、さらに、前記第2試薬75.6 μLを混合して、37℃で5分間放置した。そして、この混合液に前記第3試薬18.9 μLを混合し、37℃でインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を商品名JCA-BM8 (日本電子社製) で測定した。測定波長は、主波長751 nm、副波長805 nmとした。一方、比較例としては、第1試薬のスルホン酸化合物、第2試薬のニトロ化合物を

添加してない以外は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。これらの結果を下記表 2 に示す。

【0100】

(表 2)

	スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度 (mAbs)
実施例 2-1	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	51.3
2-2	SLS (6.4)	p-NA (0.9)	41.0
2-3	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	41.5
2-4	SLS (6.4)	NaNO ₂ (0.9)	41.5
2-5	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	277.0
		p-NA (0.9)	
2-6	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	279.0
		p-NA (0.9)	
2-7	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	267.0
		p-NA (0.9)	
2-8	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	257.0
		NaN ₃ (0.9)	
比較例 1	—	—	2.1

【0101】

前記表 2 に示すように、実施例 2 は、スルホン酸化合物および各種ニトロ化合物との併用によって、比較例に比べて、試料中の F V 量を示す吸光度が増加した。この結果から、本実施例によれば、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物によって、試料中のヘモグロビンの影響が排除されたことがわかる。

【0102】

【発明の効果】

以上のように、本発明の測定方法は、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物を試料に添加することにより、試料中のヘモグロビンの還元物質としての影響を排除できるため、信頼性に優れた測定を行なうことができる。したがって、本発明

の測定方法は、例えば、臨床医療における各種分析に適用でき、特に、糖尿病診断において重要である、赤血球中の糖化ヘモグロビン等の糖化タンパク質の測定に有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であって、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法を提供する。

【解決手段】 前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を試料に添加して、前記試料中に含まれるヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する。スルホン酸化合物としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ニトロ化合物としては、4-ニトロフェノール等が使用できる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日	2000年 6月12日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市南区東九条西明田町57番地
氏 名	アークレイ株式会社